

食道扁平上皮癌のCGH法による解析と第21番染色体長腕の解析

著者	眞山 隆人
号	3230
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/22207

氏 名（本籍） ま やま たか と
真 山 隆 人

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 3 2 3 0 号

学位授与年月日 平 成 13 年 3 月 7 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 平 成 元 年 3 月 24 日
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 食道扁平上皮癌の CGH 法による解析と第21番染
色体長腕の解析

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 里 見 進 教授 堀 井 明

教授 野 田 哲 生 教授 貫 和 敏 博

論文内容要旨

研究目的

食道扁平上皮癌を用いて CGH 法による解析を行ない、食道扁平上皮癌に生じた遺伝子異常をゲノム全体にわたって観察した。次いで今回の CGH 解析の結果と過去の研究から第 21 番染色体長腕に注目し、この領域での欠失地図を作製すべく LOH の検討を行なった。

研究方法

CGH 解析：10 例（男性 8 例，女性 2 例）の食道扁平上皮癌を用い、DNA を抽出した。腫瘍組織と同性の対照の正常 DNA に各々蛍光色素をラベルした。健康な男性の末梢血リンパ球細胞分裂中期の染色体スライドに乗せてハイブリダイゼーションさせた。更に蛍光色素を交換してラベルした “inverse CGH” を行なった。ハイブリダイゼーション後のスライドは、デジタルイメージ解析システムを用いて 2 色の蛍光の強度を解析した。

21q の LOH 解析：55 例（男性 46 例，女性 9 例）の食道扁平上皮癌を用い、対照として末梢血液細胞を用い、DNA を抽出した。21q 上の 20 のマイクロサテライトマーカーを用いて LOH 解析を行なった。プライマーの一方には末端に蛍光色素 Cy-5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) でラベルをした。PCR 産物を ALFred autosequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を使用して電気泳動し、Fragment Manager™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) でデータの解析を行なった。

研究結果

CGH 解析では高頻度のコピー数の増加は 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 11q (11q13 の増幅), 及び 20q に見られ、高頻度のコピー数の減少は 3p, 4p, 4q, 5q, 9p, 11p, 11q, 13q, 18q, 21q, 及び Y に見られた。

21q の LOH 解析では全 55 症例中 36 例 (65%) で LOH が認められた。これら 36 例中 22 例 (61%) は判別可能なすべての部位で LOH が認められた全長の欠失であった。その他の 14 例 (39%) は LOH を示した部位の他にヘテロ接合性の保持を示した部位が認められた部分的欠失であった。大部分のマイクロサテライト部位において LOH の頻度は 50% 以上であった。部分的欠失を示した症例の LOH 解析の結果から欠失地図を作成し、欠失の最小共通領域は 6 か所に見られた。30% 以上のマイクロサテライト不安定性を示した症例 (MSI-H) は無かった。LOH を示した症例と臨床病期との関係を検討したところ、特定の傾向は見られなかった。

結 論

CGH 解析では多数の染色体領域で高頻度のコピー数の増加や減少を認めた。11q13 の高頻度の増幅や 3p, 5q, 9p, 18q, 及び 21q での高頻度の欠失は他の解析法による過去の研究結果と一致した。

21q の解析では多数の症例で LOH が認められ、21q 全長にわたって高頻度に LOH が認められた。これらの症例の多くは全長にわたる欠失を示し、第 21 番染色体のモノソミーの可能性が考えられた。欠失の最小共通領域は 6 か所に見られた。21q に癌抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。

研究の意義、独創的な点

CGH 法はゲノム上のコピー数の増加と減少の両者を染色体の全領域にわたって同時に詳細に観察できる優れた分析法であり、この方法を用いて食道扁平上皮癌の解析を行なった。

食道扁平上皮癌において過去に詳しい検討がなされていなかった 21q の全長にわたっての詳細な LOH 解析を行なった。

2 つの解析方法を用いることにより食道扁平上皮癌の遺伝子異常について深く考察し、今後の研究に種々の課題を提起した。

審 査 結 果 の 要 旨

近年の癌研究の進歩に伴い、癌は複数の癌関連遺伝子に異常が起こる事により生じる疾患であることが明らかになり、各種の癌に於いてそれぞれの遺伝子異常が発見されており、さらに新たな癌関連遺伝子の検索が進められている。食道扁平上皮癌においては *p53* 及び *p16* の不活性化、*cyclin D1* の活性化などいくつかの遺伝子の異常が報告されている。しかし、大腸癌を始めとする消化器腺癌では遺伝子レベルでの癌化及び悪性化の機序が明らかになりつつあるのに対して、食道扁平上皮癌では未だに不明の部分が多いのが現状である。

本論文においては食道扁平上皮癌における遺伝子異常を研究するため、CGH 法による解析を行ない、ゲノム上のコピー数の変化を染色体の全領域にわたって詳細に観察した。その結果、11q13 の amplification など 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 11q, 及び 20q の各染色体領域において50%以上の症例でコピー数の増加を認め、同様に 3p, 4p, 4q, 5q, 9p, 11p, 11q, 13q, 18q, 21q, 及び Y の各染色体領域において50%以上の症例でコピー数の減少を認めた。その他にも種々のコピー数の異常の見られた領域を検出した。

次いで CGH 法で高頻度にコピー数の減少の認められた領域のうち、未だ詳細な検討の加えられていない第21番染色体に注目し、食道扁平上皮癌を用いて、21q に位置する20個の microsatellite marker を用いて LOH (loss of heterozygosity) の検討を行ない、全55症例中36例(65%)で LOH を認めた。これら36例中22例(61%)は判別可能なすべての部位で LOH が認められた全長の欠失であり、その他の14例(39%)は LOH を示した部位の他にヘテロ接合性の保持を示した部位が認められた部分的欠失であった。

また、これらの結果から今後の研究に有用な種々の新しい問題が提起された。

以上、本論文は食道扁平上皮癌における遺伝子異常を解析した研究として充分意義のあるものであり、学位に値する論文と認められるものである。